



## مقاله پژوهشی

# تأثیر افزودن سطوح مختلف گیاه کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*) به جیره بر فعالیت هضمی- تخمیری باکتری‌ها و قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه‌ی بره‌های پرواری عربی در شرایط برون‌تنی

مرتضی حاجی<sup>۱\*</sup>، پروین علیمیرزایی<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۱

حاجی، م. و پ. علیمیرزایی. ۱۴۰۰. تأثیر افزودن سطوح مختلف گیاه کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*) به جیره بر فعالیت هضمی-تخمیری باکتری‌ها و قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه‌ی بره‌های پرواری عربی در شرایط برون‌تنی. پژوهش‌های علوم دامی ایران ۱۳(۴): ۵۱۳-۵۲۴.

## چکیده

پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر استفاده از سطوح مختلف گیاه کاکوتی در جیره‌ی بره‌ی پرواری بر فعالیت هضمی-تخمیری باکتری‌ها و قارچ‌های استخراج شده از شکمبه‌ی آن‌ها انجام شد. در ابتدا، با روش هضم دو مرحله‌ای، بهترین سطح کامل گیاه کاکوتی در جیره مشخص شد. برای این منظور، شش تیمار حاوی سطوح صفر (شاهد)، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و یک درصد گیاه کاکوتی به یک جیره‌ی استاندارد بره‌های پرواری افزوده شد. سپس بر اساس تجزیه و تحلیل نتایج، از بین آن‌ها شاهد و تیمارهای حاوی سطوح ۰/۲ و ۰/۴ درصد برای تعیین اثر کامل کاکوتی بر فعالیت قارچ‌ها و باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه‌ای انتخاب شدند. مایع شکمبه برای آزمایش هضم دو مرحله‌ای و کشت باکتری‌ها و قارچ‌های شکمبه‌ای، از چهار رأس بره‌ی نر عربی که به مدت چهار هفته با یک جیره‌ی پرواری (مشابه با ترکیب جیره‌ی بخش آزمایشگاهی) تغذیه شده بودند، تهیه شد. قارچ‌ها و باکتری‌های بی‌هوازی نیز از مایع شکمبه‌ی آن‌ها جدا و تخلیص شدند. در آزمایش هضم دو مرحله‌ای، با افزودن کامل کاکوتی به جیره، قابلیت هضم ماده خشک، الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF) و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADF) به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد ( $P < 0.05$ ). بیشترین درصد قابلیت هضم ماده خشک، NDF و ADF در جیره‌ی حاوی ۰/۴ درصد کاکوتی و کمترین مقدار در جیره‌ی شاهد مشاهده شد؛ اما جیره‌های حاوی کاکوتی اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. غلظت نیترژن آمونیاکی و pH در محیط کشت اختصاصی قارچ‌های شکمبه در روزهای اول، سوم و ششم انکوباسیون و میانگین غلظت کل دوره و نیز در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از آغاز انکوباسیون جیره‌های آزمایشی با باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه، تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. با مکمل کردن کاکوتی در جیره، قابلیت هضم ماده خشک و NDF توسط قارچ‌ها در روز اول، سوم و ششم انکوباسیون و توسط باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از آغاز انکوباسیون و میانگین کل دوره آزمایش به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). تفاوت معنی‌داری در فعالیت هضمی قارچ‌ها و باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه در بین جیره‌های حاوی کاکوتی مشاهده نشد. در مجموع، استفاده از مکمل کاکوتی در جیره بره‌های پرواری باعث بهبود فعالیت هضمی قارچ‌ها و باکتری‌های بی‌هوازی جدا شده از شکمبه آن‌ها شد.

**واژه‌های کلیدی:** باکتری‌های جدا شده، قارچ‌های جدا شده، محیط کشت اختصاصی، هضم دو مرحله‌ای.

## مقدمه

نشخوارکنندگان دارای معده‌ی چهار قسمتی هستند که در دو قسمت اول آن یعنی شکمبه و نگاری انرژی موجود در دیواره سلولی

۱- استاد گروه علوم دامی دانشکده‌ی علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم

(\*) نویسنده مسئول:

کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، اهواز، ایران.

(Email: chaji@asnruk.ac.ir  
Doi:10.22067/ijasr.2021.38294.0

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام، گروه علوم دامی دانشکده‌ی علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ملاتانی، اهواز، ایران.

مشاهده نشد (۱۳). استفاده از گیاه کاکوتی در جیره‌ی گوسفندان دالاق، قابلیت هضم ماده خشک را بهبود داد و باعث افزایش باکتری‌های اسید لاکتیک و کل جمعیت باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه (سویه‌ها نامشخص) شد، اما تأثیری بر pH و جمعیت پروتوزای شکمبه‌ای نداشت (۲۸). از آنجایی که فعالیت قارچ‌ها و باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه‌ای در هضم مواد خوراکی اهمیت دارد و با توجه به اینکه اطلاعات محدودی در مورد اثر افزودن این گیاه به جیره بر فعالیت باکتری‌ها و قارچ‌های جداسازی شده از شکمبه‌ی بره‌های پرواری وجود دارد، بنابراین این پژوهش با هدف بررسی تأثیر مکمل کردن گیاه کاکوتی در یک جیره‌ی استاندارد بره‌ی پرواری، بر فعالیت هضمی-تخمیری باکتری‌ها و قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه‌ای انجام شد.

### مواد و روش‌ها

آزمایش حاضر در مزرعه آموزشی-تحقیقاتی و آزمایشگاه تغذیه دام پیشرفته و میکروبیولوژی شکمبه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. در بررسی منابع، اطلاعات کافی در مورد مقدار مناسب استفاده از گیاه کاکوتی به‌عنوان مکمل در جیره‌ی بره‌های پرواری وجود نداشت. لذا با توجه به هزینه‌ی زیاد محیط کشت‌های اختصاصی باکتری و قارچ‌های شکمبه، ابتدا بهترین مقدار استفاده از مکمل گیاه کاکوتی در جیره، توسط آزمایش هضم دو مرحله‌ای (۳۲) تعیین شد، سپس بهترین تیمارها برای تعیین اثر مکمل کاکوتی بر فعالیت قارچ‌ها و باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی آن‌ها انتخاب شدند. برای این منظور شش تیمار شامل شاهد (جیره‌ی پایه) و مقادیر ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و یک درصد گیاه کاکوتی پودر شده با الک ۲ میلی‌متری به یک جیره‌ی استاندارد تهیه شده برای بره‌های پرواری (۱۹) به صورت سرک افزوده شد. جیره بره‌ها شامل ۶۰ درصد علوفه (یونجه، سیلاژ ذرت، سرشاخه نیشکر) و ۴۰ درصد بخش متراکم (دانه‌ذرت، دانه جو، سیوس گندم، کنجاله سویا، مکمل معدنی-ویتامینی و نمک) بود. غلظت انرژی قابل متابولیسم و پروتئین جیره‌ها به ترتیب ۲/۷۷ مگا کالری در کیلوگرم ماده خشک و ۱۴/۳۵ درصد بود. سپس طبق داده‌های حاصل از آزمایش هضم دو مرحله‌ای (جدول ۱)، سه جیره اول آزمایش قبلی یعنی جیره‌ی شاهد (بدون کاکوتی) و جیره‌های حاوی ۰/۲ یا ۰/۴ درصد کاکوتی برای آزمایش کشت اختصاصی قارچ‌ها و باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه استفاده شدند.

مایع شکمبه‌ی لازم برای آزمایش هضم دو مرحله‌ای و کشت

گیاهان به کمک باکتری‌ها، پروتوزوا و جمعیت‌هایی نظیر قارچ‌های بی‌هوازی برای حیوان میزبان قابل دسترس می‌شود (۱۱). محصولات اصلی تخمیر شامل اسیدهای چرب فرار و پروتئین میکروبی هستند که به ترتیب در حدود ۸۰ درصد انرژی و ۶۰ تا ۸۵ درصد پروتئین مورد نیاز نشخوارکنندگان را تأمین می‌کنند (۱۱ و ۲۸). بنابراین رسیدن به بهترین بازده هضم و تخمیر میکروبی در شکمبه اهمیت زیادی دارد. از طرفی تولید متان، دی‌اکسید کربن و آمونیاک در شکمبه باعث اتلاف انرژی و پروتئین، افزایش گازهای گلخانه‌ای و آلودگی محیط زیست می‌شود (۱۱ و ۱۴). بنابراین متخصصان تغذیه از طریق دستکاری فرآیندهای تخمیری شکمبه به دنبال روش‌هایی برای کاهش اتلاف انرژی و پروتئین به صورت متان و آمونیاک و افزایش بازده تخمیر و سنتز پروتئین میکروبی در شکمبه و به دنبال آن افزایش هضم الیاف هستند. برای این منظور از افزودنی‌های متعددی مانند اسیدهای آلی، مخمرها، آنزیم‌ها، بافرها و آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده شده است (۳۴). در دهه‌های اخیر گیاهان دارویی به‌علت قابلیت‌هایی که به‌عنوان جایگزین برای مواد محرک رشد و آنتی‌بیوتیک‌ها در تغذیه دام و طیور دارند توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (۱۰). در همین ارتباط گیاهان خانواده‌ی نعنائیان که به‌عنوان یک گیاه دارویی دارای خاصیت ضد میکروبی بالایی هستند مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۵).

گونه‌ی چندساله گیاه کاکوتی<sup>۱</sup> متعلق به تیره‌ی نعنائیان است. کاکوتی به حالت وحشی در شمال، مرکز، شمال غرب، جنوب و شمال شرق ایران پراکنده شده است (۲۸). برخی از مواد مؤثره مهم موجود در کاکوتی شامل پولگون<sup>۲</sup> (۳۴/۳۸ درصد)، پی‌پرینتون<sup>۳</sup> (۱۸/۶۱ درصد)، یوموگی‌الکل<sup>۴</sup> (۱۲/۹۲ درصد)، دی‌ال‌منتول<sup>۵</sup> (۱۱/۵۱ درصد)، کارواکرول<sup>۶</sup> (۵/۴۳ درصد)، پیپرتون<sup>۷</sup> (۲/۶۸ درصد)، گاماترینین<sup>۸</sup> (۲/۶۸ درصد)، کارنون<sup>۹</sup> (۲/۵۰ درصد) می‌باشند (۱۳).

استفاده از گیاه کاکوتی در تغذیه‌ی بره‌های پرواری اثر منفی بر فعالیت هضمی و تخمیری میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ی آن‌ها در هضم مواد الیافی نظیر سرشاخه نیشکر نداشت و در مواردی اثر مثبتی بر فعالیت هضمی-تخمیری باکتری‌ها و قارچ‌های شکمبه‌ای داشت؛ به طوری که منجر به افزایش پتانسیل تولید گاز و بهبود قابلیت هضم ماده خشک و NDF سرشاخه نیشکر توسط قارچ‌های و با باکتری‌های جدا شده از شکمبه آن‌ها شد (۳). افزودن گیاهان کاکوتی، نعنای و پونه به شیر مصرفی گوساله‌ها، منجر به کاهش معنی‌دار جمعیت اشرشیاکلی و لاکتوباسیل‌ها در مدفوع گوساله‌ها در مقایسه با تیمار شاهد شد، اما تغییری در تعداد کل باکتری‌های بی‌هوازی در بین تیمارهای آزمایشی

6- Carvacrol  
7- Pipertenone  
8-  $\gamma$ -Terpinene  
9- Carnoon

1-Ziziphora clinopodioides  
2- Pulegone  
3- Piperitenone  
4- Yomogi alcohol  
5- DL-Menthol

شد.

برای تهیهی محیط کشت اختصاصی قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه، از روش تغییر یافته‌ی اورپین (۲۲) استفاده شد. به‌طور خلاصه، محیط کشت قارچ‌های شکمبه با اختلاط محلول نمکی ۱ (۳ گرم فسفات هیدروژن دی پتاسیم در یک لیتر آب مقطر)، محلول نمکی ۲ (۳ گرم فسفات هیدروژن پتاسیم، ۶ گرم سولفات آمونیوم، ۶ گرم کلرید سدیم و ۰/۶ گرم کلرید کلسیم دو آب در یک لیتر آب مقطر) با مایع شکمبه (سانتریفیوژ شده)، ۲/۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم پپتون تریپتیکاز، ۰/۵ گرم گلوکز، یک گرم سلوبیوز، ۶ گرم بی‌کربنات سدیم، یک گرم سیستئین-HCl و یک میلی‌لیتر محلول رزاورین ۰/۱ درصد، تهیه شد (۱۲). جیره‌های آزمایشی در محیط کشت اختصاصی قارچ‌های شکمبه، در دمای ۳۹ درجه سلسیوس برای مدت زمان یک، سه و شش روز کشت داده شدند. محیط کشت تحت شرایط بی‌هوازی (با افزودن گاز دی‌اکسید کربن) به داخل شیشه‌های کشت حاوی یک گرم از تیمارهای آزمایشی، انتقال داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰ درجه سلسیوس اتوکلاو شد. به این ترتیب محیط کشت اختصاصی قارچ آماده افزودن مایع تلقیح شد.

روش تهیه محیط کشت اختصاصی باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه و جداسازی آن‌ها: محیط کشت باکتری‌ها با استفاده از روش گالدول و براینات تهیه شد (۹). به‌طور خلاصه، ابتدا شیشه‌های کشت (ویال‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری) حاوی یک گرم از تیمارهای آزمایشی (نمونه‌ی آزمایشی) در داخل اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس استریل شدند. برای جداسازی ذرات شکمبه و پروتوزوا، مایع شکمبه‌ی تهیه شده از هر گروه از بره‌ها، به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد و ۲۵ میلی‌لیتر از مایع رویی آن تحت شرایط بی‌هوازی به یک لیتر محیط کشت اختصاصی باکتری‌ها، حاوی محلول نمکی ۱ و ۲ (هر کدام ۱۵۰ میلی‌لیتر)، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۲ گرم پپتون تریپتیکاز، ۷۰ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۸ درصد، ۱۰ میلی‌لیتر اسیدهای چرب فرار و ۱ میلی‌لیتر محلول رزوارین ۰/۱ درصد اضافه شد. ظروف کشت در انکوباتور با دمای ۳۹ درجه سلسیوس در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شدند. برای هر زمان چهار تکرار در نظر گرفته شد. در هر زمان محتوی شیشه‌های کشت پس از اندازه‌گیری pH و نمونه‌گیری از مایع کشت صاف شده برای سنجش نیتروژن آمونیاکی، خشک و توزین گردید و میزان ناپدید شدن ماده خشک و الیاف نامحلول در شوینده خنثی نمونه‌ها در اثر فعالیت باکتری‌ها اندازه‌گیری شد. محتوی محیط‌های کشت باکتری‌ها یا قارچ‌ها با پارچه داکرونی مخصوص صاف شد، سپس با مقدار مساوی از اسید کلریدریک ۰/۲ مولار ترکیب شد و تا زمان تعیین نیتروژن آمونیاکی به روش برودریک و کانگ (۷) در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

اختصاصی باکتری‌ها و قارچ‌های جدا شده از شکمبه، از چهار رأس بره‌ی نر تغذیه شده با یک جیره‌ی پروراری که ترکیب آن مشابه با ترکیب جیره‌ی پایه‌ی (شاهد) بخش آزمایشگاهی بود، استفاده شد. بره‌ها حداقل به‌مدت چهار هفته با جیره‌ی آزمایشی تغذیه شدند. در روز ۲۹، از هر چهار بره مایع شکمبه به‌روش لوله معدی تهیه شد و پس از اختلاط با یکدیگر به‌عنوان مایع تلقیح<sup>۱</sup> در محیط کشت باکتری‌ها و قارچ‌ها یا آزمایش هضم دو مرحله‌ای استفاده شد.

آزمایش هضم دو مرحله‌ای: مقدار ۰/۵ گرم نمونه‌های آزمایشی شامل جیره‌ی بره‌ی پروراری حاوی مقادیر مختلف مکمل گیاه کاکوتی که قبلاً با آسیاب دارای الک یک میلی‌متر خرد شده بود، در داخل لوله‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری شیشه‌ای ریخته شد و همراه با بزاق مصنوعی (۱۶) و مایع شکمبه (با نسبت ۴ به ۱، شامل ۴۰ میلی‌لیتر بزاق و ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه) در شرایط بی‌هوازی در حمام آب گرم در دمای ۳۹ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس آنزیم پپسین (مرک، ۱:۳۳۰۰) به محیط اسیدی شده اضافه شد و برای ۴۸ ساعت دیگر در حمام آب گرم قرار داده شد. پس از پایان دوره‌ی چهار روزه‌ی آزمایش، محتویات لوله‌ها صاف شدند (کاغذ واتمن شماره ۱) و پس از خشک کردن در آون (فن‌آزما تجهیز گستر ۲۴ لیتری، ایران) و سنجش مواد مغذی آن، قابلیت هضم ماده خشک، NDF و ADF جیره‌های آزمایشی محاسبه شد (۳۲).

برای جداسازی قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه، ابتدا مایع شکمبه‌ی تهیه شده از بره‌های پروراری تغذیه شده با جیره‌ی آزمایشی، توسط پارچه‌ی متقال چهار لایه صاف شد و در ۱۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا پروتوزوا جدا شوند. سپس با افزودن یک میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین-استرپتومایسین و کلرامفنیکل، هر یک با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) باکتری‌ها حذف شدند (۱۸). مقدار ۵ میلی‌لیتر از این قارچ‌های جدا شده به‌عنوان مایع تلقیح به شیشه‌های کشت ۱۰۰ میلی‌لیتری (با درب پرسی) که محتوی ۳۵ میلی‌لیتر محیط کشت اختصاصی قارچ به‌همراه یک گرم جیره‌های آزمایشی به‌عنوان نمونه آزمایشی بودند اضافه شد. کشت طبق شرایط دمایی و زمانی که در ادامه شرح داده می‌شود، انجام شد. برای به دست آوردن محیط کشت خالص، سه مرحله عمل کشت با افزودن ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت قبلی به ۳۵ میلی‌لیتر محیط کشت جدید تکرار شد. در هر یک از روزهای اول، سوم و ششم رشد قارچ‌های شکمبه، برای هر تیمار چهار تکرار (شیشه کشت) برای اندازه‌گیری pH (pH متر، WTW 3110، آلمان) و نیتروژن آمونیاکی (۷) در نظر گرفته شد، پس از آن که محتوی شیشه‌ها صاف، خشک و توزین شدند، درصد ناپدید شدن ماده خشک و الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF) تیمارهای آزمایشی در اثر فعالیت قارچ‌ها، با توجه به اختلاف ماده اولیه و مواد باقیمانده محاسبه

داده‌های حاصل از آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (ویرایش ۹/۱) تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه‌ی میانگین‌ها برای اختلاف‌های معنی‌دار، با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد. مدل آماری طرح به صورت زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

در این مدل،  $Y_{ij}$ : مقدار هر مشاهده،  $\mu$ : میانگین جامعه،  $T_i$ : اثر تیمار  $i$  و  $\varepsilon_{ij}$ : خطای آزمایشی بود.

اندازه‌گیری ترکیب شیمیایی: پس از آسیاب کردن نمونه‌های مورد آزمایش با الک دو میلی‌متری، ماده خشک نمونه‌ها و باقیمانده‌های پس از انکوباسیون آن‌ها با میکروارگانیزم‌های شکمبه (در آزمایش هضم دو مرحله‌ای)، قارچ‌ها و یا باکتری‌های شکمبه در آون (فن‌آزمای تجهیز گستر ۲۴ لیتری، ایران) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۹۵ درجه سلسیوس تعیین شد (۵). الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (۵) و الیاف نامحلول در شوینده خنثی تیمارها قبل و بعد از انکوباسیون (بدون استفاده از آمیلاز و با حذف خاکستر) اندازه‌گیری شد (۳۳).

جدول ۱- اثر مکمل کاکوتی بر قابلیت هضم مواد مغذی جیره‌ی بره‌های پرواری در شرایط برون‌تنی<sup>۱</sup>

Table 1- Effect of *Ziziphora clinopodioides* supplement on *in vitro* nutrients digestibility of fattening lambs diet<sup>1</sup>

تیمارها <sup>۲</sup> Treatment <sup>2</sup>	درصد قابلیت هضم Digestibility (%)		
	ماده خشک Dry matter	الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDF	الیاف نامحلول در شوینده اسیدی NDF
شاهد (جیره پایه <sup>۳</sup> ) Control (basal diet <sup>3</sup> )	55.27 <sup>b</sup>	47.44 <sup>b</sup>	36.50 <sup>b</sup>
جیره پایه + ۰/۲ درصد کاکوتی Basal diet + 0.2% ZC	59.81 <sup>a</sup>	52.29 <sup>a</sup>	39.60 <sup>a</sup>
جیره پایه + ۰/۴ درصد کاکوتی Basal diet + 0.4% ZC	60.71 <sup>a</sup>	53.02 <sup>a</sup>	42.01 <sup>a</sup>
جیره پایه + ۰/۶ درصد کاکوتی Basal diet + 0.6% ZC	59.11 <sup>a</sup>	53.19 <sup>a</sup>	39.70 <sup>a</sup>
جیره پایه + ۰/۸ درصد کاکوتی Basal diet + 0.8% ZC	58.70 <sup>a</sup>	52.78 <sup>a</sup>	39.50 <sup>a</sup>
جیره پایه + یک درصد کاکوتی Basal diet + 1.0% ZC	57.91 <sup>ab</sup>	51.98 <sup>a</sup>	40.04 <sup>a</sup>
SEM	1.45	1.28	1.36
<i>P</i> -value	0.03	0.03	0.01

<sup>۱</sup> در هر ستون میانگین‌های با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند ( $P < 0.05$ ).

<sup>۲</sup> جیره‌های آزمایشی که با مایع شکمبه بره‌های پرواری تغذیه شده با جیره پایه انکوباسیون شدند.

<sup>۳</sup> جیره پایه، یک جیره‌ی استاندارد بره پرواری فاقد کاکوتی بود.

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

<sup>۱</sup> Mean within the same column with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

<sup>۲</sup> Experimental diets incubated with rumen fluid of fattening lambs fed basic diet.

<sup>۳</sup> Basic diet was a standard diet of fattening lamb without *Ziziphora clinopodioides* (ZC).

SEM: Standard error of the means

## نتایج و بحث

خشک و الیاف نامحلول در شوینده خنثی در جیره حاوی ۰/۴ درصد کاکوتی (تیمار ۳) و کمترین مقدار در جیره شاهد مشاهده شد. با این‌حال، اختلاف بین جیره‌های حاوی کاکوتی عددی و غیر معنی‌دار بود ( $P > 0.05$ ). افزایش قابلیت هضم مواد مغذی در اثر افزودن کاکوتی شاید به این دلیل باشد که ترکیبات موثره‌ی کاکوتی فعالیت میکروارگانیزم‌های شکمبه را تقویت کرده است. به عبارت دیگر، افزایش قابلیت هضم ممکن است به دلیل تغییر در جمعیت میکروبی و

تعیین مقدار مناسب استفاده از گیاه کاکوتی در جیره بره‌ی پرواری: تحت تاثیر افزودن مکمل کاکوتی به جیره بره‌های پرواری، قابلیت هضم آزمایشگاهی ماده خشک، الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF) و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADF) (جدول ۱) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). بیشترین مقدار قابلیت هضم ماده

و pH محیط کشت اختصاصی قارچ‌های شکمبه در روزهای اول، سوم و ششم انکوباسیون تحت تأثیر افزودن کاکوتی به جیره بره‌های پرواری قرار نگرفت. با افزایش مدت زمان انکوباسیون از روز اول تا ششم، مقدار نیتروژن آمونیاکی تولیدی تغییر معنی‌داری نداشت. میانگین غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH محیط کشت اختصاصی قارچ‌های شکمبه نیز تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت. آزمایش‌ها در مورد بررسی اثر کاکوتی یا ترکیبات موثره آن بر قارچ‌های جداسازی شده شکمبه بسیار محدود بود، لذا در بحث اثر مواد موثره موجود در گیاهان دیگر که مشابه کاکوتی بودند بر قارچ‌ها و یا سایر میکروارگانیسم‌های شکمبه بررسی شدند. موافق با نتایج آزمایش حاضر، در حین مطالعه قابلیت هضم و تخمیر سرشاخه نیشکر توسط قارچ‌های شکمبه جداسازی شده از شکمبه گوسفندان تغذیه شده با جیره‌های حاوی مکمل کاکوتی، تأثیری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH محیط کشت آن‌ها مشاهده نشد (۳). استفاده از مکمل کاکوتی در جیره بره‌های پرواری نیز تأثیری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH شکمبه آن‌ها نداشت (۴). استفاده از اسانس مروتلخ (دارای ۱-۸ سینتول و لینالول مشابه کاکوتی) نیز تأثیری بر میانگین غلظت نیتروژن آمونیاکی محیط کشت پیوسته میکروارگانیسم‌های شکمبه نداشت (۲۳).

بهبود فعالیت هضم و تخمیر آن‌ها در اثر این ترکیبات ثانویه باشد (۲). ذکر شده که برخی متابولیت‌های ثانویه نظیر ترکیبات فنولی (که در کاکوتی هم وجود دارد) به‌طور انتخابی سبب مهار فعالیت باکتری‌های آمیلولیتیک و پروتئولیتیک می‌شوند، بدون اینکه اثری بر سایر میکروارگانیسم‌ها نظیر سلولیتیک‌ها داشته باشند (۳۴). لذا، این اثر انتخابی منجر به حذف رقابتی برخی گونه‌ها به نفع سایر گونه‌ها می‌شود، بنابراین، مواد اولیه محیط برای فعالیت گونه‌هایی دیگر فراهم می‌شود شاید همین ساز و کار عامل بهبود قابلیت هضم در جیره‌های حاوی کاکوتی باشد. مطابق نتایج آزمایش حاضر، به‌ترتیب افزایش قابلیت هضم و تخمیر سرشاخه نیشکر یا جیره با افزودن کاکوتی به جیره بره‌ها (۳) یا افزودن سایر ترکیبات تانن‌دار نظیر گیاه خارمریم (مانند کاکوتی حاوی تانن) به جیره گوساله‌ها گزارش شده است (۲۱). گیاه زنیان (دارای تیمول و گاما تریپنین مشابه کاکوتی) نیز باعث افزایش هضم و تخمیر خوراک شده است (۲۰) که با آزمایش حاضر مطابقت دارد. بنابراین، افزایش قابلیت هضم مواد مغذی نشان می‌دهد که ترکیبات فنلی موجود در کاکوتی (۱۷) به‌عنوان مواد ضد تغذیه‌ای تأثیر منفی بر تخمیر میکروارگانیسم‌های شکمبه نداشتند است. نتایج ارائه شده در جدول ۲ نشان داد که غلظت نیتروژن آمونیاکی

**جدول ۲- نیتروژن آمونیاکی و pH حاصل از تخمیر جیره‌های حاوی مکمل کاکوتی انکوبه شده با قارچ‌های بی‌هوازی جدا شده از مایع شکمبه بره‌های پرواری<sup>۱</sup>**  
**Table 2- Ammonia-N and pH of experimental diets containing *Ziziphora clinopodioides* incubated with anaerobic fungi isolated from rumen fluid of fattening lambs fed with basal diet<sup>1</sup>**

تیمارها <sup>۲</sup> Treatment <sup>2</sup>	زمان انکوباسیون (روز) Incubation time (day)							
	pH	اول First	pH	سوم Third	pH	ششم Sixth	pH	میانگین Average
		نیتروژن آمونیاکی NH <sub>3</sub> -N (mg/100 ml)		نیتروژن آمونیاکی NH <sub>3</sub> -N (mg/100 ml)		نیتروژن آمونیاکی NH <sub>3</sub> -N (mg/100 ml)		نیتروژن آمونیاکی NH <sub>3</sub> -N (mg/100 ml)
شاهد (جیره پایه <sup>۳</sup> ) Control (basal diet <sup>3</sup> )	6.30	12.68	6.40	12.68	6.30	13.77	6.33	13.04
جیره پایه + ۰/۲ درصد کاکوتی Basal diet + 0.2% ZC	6.10	12.47	6.20	12.84	6.30	13.72	6.20	13.01
جیره پایه + ۰/۴ درصد کاکوتی Basal diet + 0.4% ZC	6.20	12.76	6.20	13.57	6.30	13.51	6.23	13.28
SEM	0.15	0.66	0.13	0.75	0.04	0.31	0.14	0.57
P-value	0.11	0.09	0.32	0.17	0.80	0.61	0.13	0.30

<sup>۱</sup> در هر ستون میانگین‌های با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند ( $P < 0.05$ ).

<sup>۲</sup> جیره‌های آزمایشی که با مایع شکمبه بره‌های پرواری تغذیه شده با جیره پایه انکوباسیون شدند.

<sup>۳</sup> جیره پایه، یک جیره استاندارد بره پرواری فاقد کاکوتی بود.

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

<sup>۱</sup> Mean within the same column with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

<sup>۲</sup> Experimental diets incubated with rumen fluid of fattening lambs fed basic diet.

<sup>۳</sup> Basic diet was a standard diet of fattening lamb without *Ziziphora clinopodioides* (ZC).

SEM: Standard error of the means

شرایط برون‌تنی با استفاده از گیاه پونه (دارای ۱ و ۸ سینتول مشابه

برخلاف نتایج آزمایش حاضر، کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در

دیگری، اسانس نعناع (۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم در لیتر) که مشابه کاکوتی حاوی کاروون، لیمونن، لینالول و ۱ و ۸ سینتول است، در شرایط آزمایشگاهی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون باعث افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی شد (۳۰).

**جدول ۳-** قابلیت هضم ماده خشک و الیاف نامحلول در شوینده خنثی حاصل از تخمیر جیره‌های حاوی مکمل کاکوتی انکوبه شده با قارچ‌های بی‌هوازی جدا شده از مایع شکمبه بره‌های پرواری<sup>۱</sup>

**Table 3-** Digestibility of dry matter and NDF of experimental diets containing *Ziziphora clinopodioides* incubated with anaerobic fungi isolated from rumen fluid of fattening lambs<sup>1</sup>

تیمارها <sup>۲</sup> Treatment <sup>2</sup>	زمان انکوباسیون (روز) Incubation time (day)							
	اول First		سوم Third		ششم Sixth		میانگین Average	
	ماده خشک Dry matter	الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDF	ماده خشک Dry matter	الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDF	ماده خشک Dry matter	الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDF	ماده خشک Dry matter	الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDF
شاهد (جیره پایه <sup>۳</sup> ) Control (basal diet <sup>3</sup> )	36.82 <sup>b</sup>	34.50 <sup>b</sup>	48.80 <sup>b</sup>	45.21 <sup>b</sup>	53.52 <sup>b</sup>	50.15 <sup>b</sup>	46.38 <sup>b</sup>	43.29 <sup>b</sup>
جیره پایه + ۰/۲ درصد کاکوتی Basal diet + 0.2% ZC	38.40 <sup>a</sup>	36.72 <sup>a</sup>	54.03 <sup>a</sup>	51.97 <sup>a</sup>	57.26 <sup>a</sup>	53.02 <sup>a</sup>	49.90 <sup>a</sup>	47.24 <sup>a</sup>
جیره پایه + ۰/۴ درصد کاکوتی Basal diet + 0.4% ZC	39.08 <sup>a</sup>	37.85 <sup>a</sup>	54.57 <sup>a</sup>	52.06 <sup>a</sup>	57.84 <sup>a</sup>	53.41 <sup>a</sup>	50.50 <sup>a</sup>	47.77 <sup>a</sup>
SEM	0.03	0.05	0.04	0.038	0.037	0.026	0.034	0.037
P-value	0.03	0.04	0.03	0.04	0.03	0.02	0.02	0.03

<sup>۱</sup> در هر ستون میانگین‌های با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند ( $P < 0.05$ ).

<sup>۲</sup> جیره‌های آزمایشی که با مایع شکمبه بره‌های پرواری تغذیه شده با جیره پایه انکوباسیون شدند.

<sup>۳</sup> جیره پایه، یک جیره استاندارد بره پرواری فاقد کاکوتی بود.

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

<sup>1</sup> Mean within the same column with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

<sup>2</sup> Experimental diets incubated with rumen fluid of fattening lambs fed basic diet.

<sup>3</sup> Basic diet was a standard diet of fattening lamb without *Ziziphora clinopodioides* (ZC).

SEM: Standard error of the means

به ترتیب، از روز اول تا ششم یا ساعات ۲۴ تا ۷۲، درصد قابلیت هضم ماده خشک و الیاف نامحلول در شوینده خنثی افزایش یافت. شاید بهبود هضم ماده خشک و NDF در محیط کشت قارچ‌ها و باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه به سبب تأثیر ترکیبات ثانویه موجود در کاکوتی باشد که منجر به تغییر در جمعیت میکروبی و به دنبال آن بهبود فعالیت هضم آن‌ها شده باشد (۲). به طوری که، ترکیبات فنولی که در کاکوتی نیز وجود دارد، سبب مهار فعالیت باکتری‌های آمیلولیتیک و پروتولیتیک می‌شوند، اما اثری بر سایر میکروارگانیسم‌ها نظیر سلولیتیک‌ها ندارند (۳۴).

قابلیت هضم ماده خشک و الیاف نامحلول در شوینده خنثی جیره‌های آزمایشی توسط قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه (جدول ۳) در روز اول، سوم و ششم انکوباسیون و توسط باکتری‌های بی‌هوازی (جدول ۴) در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ و میانگین کل دوره آزمایش، تحت تأثیر افزودن مکمل کاکوتی به جیره بره‌های پرواری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. برای هر دو گروه قارچ‌ها و باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه بین جیره‌های حاوی دو سطح ۰/۲ و ۰/۴ درصد کاکوتی تفاوت معنی‌داری در هضم جیره‌ها مشاهده نشد. با افزایش مدت انکوباسیون در محیط کشت اختصاصی قارچ‌ها و باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه

**جدول ۴-** قابلیت هضم ماده خشک و الیاف نامحلول در شوینده خنثی حاصل از تخمیر جیره‌های آزمایشی حاوی مکمل کاکوتی انکوبه شده با باکتری‌های بی‌هوازی جدا شده از مایع شکمبه بره‌های پرواری<sup>۱</sup>

**Table 4-** Digestibility of dry matter and NDF of experimental diets containing *Ziziphora clinopodioides* incubated with anaerobic bacteria isolated from rumen fluid of fattening lambs<sup>1</sup>

تیمارها <sup>۲</sup> Treatment <sup>2</sup>	زمان انکوباسیون (ساعت) Incubation time (h)						میانگین Average	
	0-24		24-48		48-72		ماده خشک Dry matter	الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDF
شاهد (جیره پایه <sup>۳</sup> ) Control (basal diet <sup>3</sup> )	42.57 <sup>b</sup>	40.53 <sup>b</sup>	50.64 <sup>b</sup>	48.77 <sup>b</sup>	56.65 <sup>b</sup>	51.85 <sup>b</sup>	49.95 <sup>b</sup>	47.05 <sup>b</sup>
جیره پایه + ۰/۲ درصد کاکوتی Basal diet + 0.2% ZC	44.43 <sup>a</sup>	42.94 <sup>a</sup>	54.16 <sup>a</sup>	52.80 <sup>a</sup>	58.17 <sup>a</sup>	54.24 <sup>a</sup>	52.25 <sup>a</sup>	49.99 <sup>a</sup>
جیره پایه + ۰/۴ درصد کاکوتی Basal diet + 0.4% ZC	45.86 <sup>a</sup>	43.64 <sup>a</sup>	54.29 <sup>a</sup>	52.92 <sup>a</sup>	58.70 <sup>a</sup>	54.07 <sup>a</sup>	52.95 <sup>a</sup>	52.21 <sup>a</sup>
SEM	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02
P-value	0.01	0.03	0.03	0.02	0.03	0.04	0.02	0.04

<sup>۱</sup> در هر ستون میانگین‌های با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند ( $P < 0.05$ ).

<sup>۲</sup> جیره‌های آزمایشی که با مایع شکمبه بره‌های پرواری تغذیه شده با جیره پایه انکوباسیون شدند.

<sup>۳</sup> جیره پایه، یک جیره‌ی استاندارد بره پرواری فاقد کاکوتی بود.

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

<sup>1</sup> Mean within the same column with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

<sup>2</sup> Experimental diets incubated with rumen fluid of fattening lambs fed basic diet.

<sup>3</sup> Basic diet was a standard diet of fattening lamb without *Ziziphora clinopodioides* (ZC).

SEM: Standard error of the means

شکمبه، تحت تأثیر سطوح مختلف خارمریم (حاوی تانن مشابه کاکوتی) قرار نگرفت (۲۱). در مطالعه‌ی دیگری نیز قابلیت هضم ماده خشک و NDF جیره تحت تأثیر سطوح مختلف اسانس نعناع فلفلی (دارای پولگون مشابه کاکوتی) قرار نگرفت (۱). در آزمایشی، ناپدید شدن ماده خشک و NDF سرشاخه نیشکر انکوبه شده با باکتری‌های شکمبه جدا شده از گوسفندان تغذیه شده با کاکوتی، در ۲۴ ساعت اول انکوباسیون بیشتر از شاهد بود، اما در روزهای سوم و ششم تفاوت فقط عددی بود (۳)؛ همچنین با افزایش مدت زمان انکوباسیون، میزان هضم‌پذیری افزایش یافت. در مطالعه‌ی دیگری، قابلیت هضم NDF و ماده خشک خوراک گوسفندانی که با یک جیره حاوی ۳ و ۶ درصد گل میمونی سازویی (دارای لینالول مشابه کاکوتی) تغذیه شده بودند، نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد (۲۴ و ۲۵).

لذا، این اثر انتخابی منجر به حذف رقابتی برخی گونه‌ها به نفع سایر گونه‌ها می‌شود، احتمالاً این مکانیسم یکی از عوامل بهبود دهنده قابلیت هضم در جیره‌های حاوی کاکوتی باشد. از طرفی، ترکیبات فلاونوئیدی کاکوتی ممکن است باعث بهبود قابلیت هضم شده باشند؛ زیرا پژوهشگران نشان دادند که تجزیه میکروبی فلاونوئیدها در شکمبه می‌تواند نقش جایگزین منبع کربن را برای میکروارگانیسم‌ها داشته باشد و منجر به بهبود فعالیت هضمی آن‌ها شود (۲۹). در آزمایشی، قابلیت هضم آزمایشگاهی ماده خشک و NDF سرشاخه نیشکر توسط قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه تحت تأثیر افزودن کاکوتی به جیره گوسفندان قرار نگرفت (۳). درصد قابلیت هضم جیره‌ها در بره‌های تغذیه شده با کاکوتی در مقایسه با جیره شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (۴). مقدار ناپدید شدن ماده خشک و NDF جیره توسط قارچ‌های

انکوباسیون نیز تفاوتی بین تیمارها از نظر غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH محیط کشت باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه وجود نداشت. شاید انتظار می‌رفت که ترکیبات ضدتغذیه‌ای موجود در کاکوتی نظیر ترکیبات فنلی (۱۷) منجر به تغییراتی در غلظت نیتروژن آمونیاکی شوند، زیرا این ترکیبات باعث اتصال به پروتئین‌ها و مانع تجزیه آن‌ها توسط باکتری‌های شکمبه می‌شوند (۶)، اما این عدم تغییر نشان داد که وجود ترکیبات ثانویه در کاکوتی، به اندازه‌ای که در آزمایش حاضر استفاده شده بود، مانعی برای هضم پروتئین توسط باکتری‌های شکمبه نیست. برخی از اسانس‌های گیاهی (رازیان، فلفل دلمه، دارچین، میخک، شوید، سیر، زنجبیل، پونه کوهی و درخت چای) و اجزای اصلی آن (آنتول، کارواکرول، کاروون، اتوژنول و غیره) به‌طور قابل توجهی غلظت نیتروژن آمونیاکی را در غلظت‌های بالا (۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) کم می‌کنند، اما اثرات در دوزهای متوسط (۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در خط مرزی بوده و در دوزهای پایین (۳ میلی‌گرم در لیتر) اثری وجود نداشت (۸).

در آزمایشی، استفاده از انواع گیاهان دارویی (حاوی ترکیبات فنولی، مثل کاکوتی) در جیره، باعث افزایش قابلیت هضم ماده خشک شد (۲، ۳، ۲۰). به‌علاوه، مواد مؤثره کاکوتی به‌ویژه ترکیبات فلاونوئیدی آن با ساز و کار دیگری نیز ممکن است باعث بهبود قابلیت هضم شده باشند. به‌طوری‌که، پژوهشگران گزارش کردند که تجزیه میکروبی فلاونوئیدها در شکمبه می‌تواند نقش جایگزین منبع کربن را برای فعالیت میکروبی بازی کند و منجر به تأثیر بر فعالیت هضمی آن‌ها شود (۲۹). در پژوهشی، قابلیت هضم ماده خشک در گوسفند تحت تأثیر افزودن اسانس پونه‌کوهی (دارای پولگون مشابه کاکوتی) قرار نگرفت (۲۶). همچنین، قابلیت هضم مواد مغذی با افزودن سطوح مختلف ۸ گیاه دارویی افزایش و با ۴ اسانس گیاهی کاهش یافت (۳۱). غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از آغاز انکوباسیون جیره‌های آزمایشی با باکتری‌ها بی‌هوازی شکمبه تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (جدول ۵). با افزایش مدت انکوباسیون تا ۷۲ ساعت، تغییر محسوس در غلظت نیتروژن آمونیاکی و یا pH مشاهده نشد. برای میانگین کل زمان‌های

**جدول ۵-** نیتروژن آمونیاکی و pH حاصل از تخمیر جیره‌های حاوی مکمل کاکوتی انکوبه شده با باکتری‌های بی‌هوازی جدا شده از مایع شکمبه بره‌های پرواری<sup>۱</sup>  
**Table 5-** Ammonia-N and pH of experimental diets containing *Ziziphora clinopodioides* incubated with anaerobic bacteria isolated from rumen fluid of fattening lambs<sup>1</sup>

تیمارها <sup>۲</sup> Treatment <sup>2</sup>	زمان انکوباسیون (ساعت) Incubation time (h)							
	0-24		24-48		48-72		میانگین Average	
	pH	نیتروژن آمونیاکی NH <sub>3</sub> -N (mg/dl)	pH	نیتروژن آمونیاکی NH <sub>3</sub> -N (mg/dl)	pH	نیتروژن آمونیاکی NH <sub>3</sub> -N (mg/dl)	pH	نیتروژن آمونیاکی NH <sub>3</sub> -N (mg/dl)
شاهد (جیره پایه <sup>۳</sup> ) Control (basal diet <sup>3</sup> )	6.20	12.02	6.30	12.16	6.20	11.73	6.24	11.97
جیره پایه + ۰/۲ درصد کاکوتی Basal diet + 0.2% ZC	6.10	11.57	6.20	12.26	6.10	12.50	6.14	12.11
جیره پایه + ۰/۴ درصد کاکوتی Basal diet + 0.4% ZC	6.10	12.72	6.10	12.80	6.20	13.23	6.14	12.92
SEM	0.04	0.90	0.06	0.64	0.05	0.79	0.06	0.78
P-value	0.13	0.19	0.10	0.18	0.50	0.11	0.25	0.16

<sup>۱</sup> در هر ستون میانگین‌های با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند ( $P < 0.05$ ).

<sup>۲</sup> جیره‌های آزمایشی که با مایع شکمبه بره‌های پرواری تغذیه شده با جیره پایه انکوباسیون شدند.

<sup>۳</sup> جیره پایه، یک جیره استاندارد بره پرواری فاقد کاکوتی بود.

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

<sup>1</sup> Mean within the same column with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

<sup>2</sup> Experimental diets incubated with rumen fluid of fattening lambs fed basic diet.

<sup>3</sup> Basic diet was a standard diet of fattening lamb without *Ziziphora clinopodioides* (ZC).

SEM: Standard error of the means

نیشکر در محیط کشت حاوی باکتری‌های جداسازی شده از شکمبه گوسفندان تغذیه شده با مقادیر مختلف کاکوتی تفاوت معنی‌داری نسبت

در آزمایشی غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH برای میانگین کل زمان‌های انکوباسیون و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون سرشاخه



استفاده از مکمل کاکوتی در ترکیب جیره بره‌های پرواری منجر به بهبود فعالیت هضمی و تخمیری میکروارگانیسم‌های شکمبه در شرایط برون‌تنی شد. با افزودن مقادیر مختلف کاکوتی به جیره، قابلیت هضم جیره‌ی بره‌های پرواری توسط کل میکروارگانیسم‌های شکمبه (در آزمایش هضم دو مرحله‌ای) و یا باکتری‌ها و قارچ‌های بی‌هوازی جدا شده از شکمبه در مقایسه با جیره شاهد افزایش نشان داد. از طرفی، بین مقدار ۰/۲ درصد کاکوتی در جیره با ۰/۴ درصد آن تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، بنابراین مقدار ۰/۲ درصد برای استفاده در جیره بره‌های پرواری توصیه می‌شود؛ اگرچه برای تقویت این پیشنهاد، انجام آزمایش‌های تکمیلی بیشتر در شرایط حیوان زنده نیز توصیه می‌شود.

### تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان برای فراهم آوردن امکان انجام آزمایش قدردانی می‌شود.

به جیره شاهد نداشتند، اما در زمان ۷۲ ساعت، غلظت نیتروژن آمونیاکی تولیدی نسبت به زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت کاهش یافت (۳). گزارش شده که استفاده از غلظت‌های مختلف اسانس پونه‌کوهی (دارای کارواکرول مشابه کاکوتی)، غلظت نیتروژن آمونیاکی محیط کشت را در شرایط آزمایشگاهی کاهش می‌دهد (۸). پژوهشگران نشان دادند که اضافه کردن تیمول (ماده موثره کاکوتی) به مایع شکمبه حاوی کازئین (یک گرم بر لیتر) منجر به تجمع اسید آمینه و کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی می‌شود (۶) که نشان دهنده مهار دامیناسیون اسیدهای آمینه توسط باکتری‌های شکمبه است. در تحقیق دیگری، اسانس نناع (دارای پولگون مشابه کاکوتی) تأثیر معنی‌داری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه گوسفند نداشت (۱). اما اسانس رزماری (دارای سینئول مشابه کاکوتی) باعث کاهش معنی‌دار غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه گوسفند قزل شد (۲۷).

### نتیجه‌گیری کلی

### References

- Ahmadi Naghadehi, A. A., R. Pirmohammadi, M. Sahraei Belverdy, and Kh. Parsaeimehr. 2015. Effect of peppermint (*Mentha Piperita L.*) on digestibility and rumen fermentation of Makuei sheep. *Animal Science Journal*, 28 (1): 65-77. (In Persian).
- Alexander, G., B. Singh, A. Sahoo, and T. K. Bhat. 2008. *In vitro* screening of plant extracts to enhance the efficiency of utilization of energy and nitrogen in ruminant diets. *Animal Feed Science and Technology*, 145: 229-242.
- Alimirzaii, P., and M. Cahji. 2019. Effect of feeding *Ziziphora clinopodioides* to finishing lambs on the activity of rumen fungi and bacteria in digestion and fermentation of sugarcane top. *Animal Production Research*, 8 (1): 29-39. (In Persian).
- Alimirzaii, P., and M. Cahji. 2019. The effect of supplementation medicinal plant of *Ziziphora cliniopodiodes* in diet on growth performance, digestibility of nutrients, and some meat quality indices of Arabian-Romanov lambs. *Journal of Veterinary Research*, 76 (1): 31-43. (In Persian).
- AOAC International. 2012. *Official Methods of Analysis*. 19<sup>th</sup> ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Benchaar, C., A. V. Chaves, G. R. Fraser, Y. Wang, K. A. Beauchemin, and T. A. McAllister. 2007. Effects of essential oils and their components on *in vitro* rumen microbial fermentation. *Canadian Journal of Animal Science*, 87: 413-449.
- Brodrick, G. A., and J. H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science*, 63: 64-75.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Camel. 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89: 761-771.
- Caldwell, D. R., and M. P. Bryant 1966. Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Apply Microbiology*, 14: 794-801.
- Calsamiglia, S., M. Busquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos, and A. Ferret. 2007. Invited Review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90: 2580-2595.
- Chaji, M. 2020. *Applied Animal Nutrition: Feeds and Feeding*. Second ed. Norbaksh, Teharn.
- Davies, D. R., M. K. Theodorou, M. I. Lawrence, and Trinci A. P. J. 1993. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. *Journal of General Microbiology*, 139: 1395-1400.
- Ghahhari, N., T. Ghoorchi, and S. A. Vakili. 2016. Effect of adding herbs (*Ziziphora clinopodioides*, *Mentha spicata* and *Mentha pulegium*) in milk on performance, blood metabolites and fecal microbial population on Holstein calves. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 8 (1): 57-71. (In Persian).
- Khezrian, A., M. E. Nooriyan Soroor, and M. M. Moeini. 2016. The effect of plant and essential oils of *Mentha longifolia* on *in vitro* ruminal fermentation parameters, methane production and protozoa population of goat. *Journal of Animal production*, 18 (3): 477-490. (In Persian).
- Mahboubi, M., and Gh. Haghi. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium L.*

- essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 325-327.
16. McDougall, E. L. 1948. Studies on ruminant saliva. The composition and output of sheep saliva. *Journal of Biochemistry*, 43: 99-106.
  17. Minooeian Haghghi, M. H., and A. R. Khosravi. 2013. Inhibition and destruction effects of *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides* and *Nigella sativa* essences on *Aspergillus* cells. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 15 (6): 25-35. (In Persian).
  18. Mohammadabadi, T., M. Danesh Mesgaran, M. Chaji, and R. Tahmasebi. 2012. Evaluation of the effect of fat content of sunflower meal on rumen fungi growth and population by direct (quantitative competitive polymerase chain reaction) and indirect (dry matter and neutral detergent fiber disappearance) methods. *African Journal of Biotechnology*, 11 (1): 179-183.
  19. National Research Council. 2007. Nutrient requirements of small ruminants, sheep, goats, cervids, and new world camelids. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
  20. Nemati, F., Y. Roozbehani, M. A. Karimi Torshizi, and J. Rezaei. 2012. An Investigation of the effect of some medicinal plants on *in vitro* ruminal fermentation parameters. *Iranian Journal of Animal Science*, 43 (2): 193-206. (In Persian).
  21. Nikzad, Z., M. Chaji, K. Mirzadeh, T. Mohammadabadi, and M. Sari. 2015. Effect of diets containing different levels of Milk Thistle and grains with different degradation rate on rumen fungi of Khuzestan buffalo. *Journal of Veterinary Research*, 70 (2): 213-225. (In Persian).
  22. Orpin, C. G. 1977. The rumen flagellate *Piromonas communis*: its life history and invasion of plant material in the rumen. *Journal of General Microbiology*, 99: 107-117.
  23. Ouladshane, Y., M. Sari, M. Chaji, T. Mohammadabadi, and M. Boojarpour. 2014. Investigating the effects of *Salvia mirzayanii* essential oil on rumen microbial fermentation and nutrient digestibility using gas production and dual flow continuous culture system. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 6(1): 54-65. (In Persian).
  24. Rezaee, F., T. Mohammadabadi, M. Chaji, and M. R. Mashayekhi. 2016. Effect of feeding *Scrophularia striata* Boiss on fermentation, gas production and *in vitro* digestibility characteristics of Lori- Bakhtiari sheep. *Animal Production Research*, 5(3): 83-92. (In Persian).
  25. Rezaee, F., T. Mohammadabadi, M. Chaji, and M. R. Mashayekhi. 2016. Effects of phenolic components of *Scrophularia striata* Boiss powder on feed intake, digestibility, rumination and rumen protozoa population in Lori-Bakhtiari sheep. *Iranian Journal of Animal Science*, 47: 155-164. (In Persian).
  26. Shahabi, H., Y. Chashmidel, A. Teimori Yansari, and S. A. Jafarpour. 2016. Effect of oregano essential oil and canola oil on apparent digestibility, ruminal pH, ammonia, and carcass quality characteristics of fattening Dalagh lambs. *Research on Animal Production*, 7(13): 135-127. (In Persian).
  27. Sahraei Belverdy, M., and R. Pirmohammadi. 2014. Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils on digestibility, blood and rumen parameters of Ghezel sheep. *Animal Science Journal*, 27(103): 71-82. (In Persian).
  28. Salamat, A., T. Ghorchi, F. Ghanbari, and O. Ashayerizadeh. 2015. Determination of degradability and the effect of *Ziziphora tenuior* L. on dry matter digestibility rumen microbial population and blood parameters of Dalaq sheep. *Journal of Livestock Research*, 4 (3):23-24. (In Persian).
  29. Smith, H., E. Zoetendal, and R. I. Mackie. 2005. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial Ecology*. 50(2): 197-205.
  30. Taghavinezhad, M., D. Alipour, M. Torabi Goudarzi, P. Zamani, and G. Khodakaramian. 2011. Dose response to carvone rich essential oils of spearmint (*Mentha spicata* L.): *in vitro* ruminal fermentation kinetics and digestibility. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13: 1013-1020.
  31. Tekippe, J. A., A. N. Hristov, K. S. Heyler, T. W. Cassidy, V. W. Zheljzkov, J. F. S. Ferreira, S. K. Karnati, and G. A. Varga. 2011. Rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90: 5056-5079.
  32. Tilley, J. M. A., and R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society*, 18: 104-111.
  33. Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597.
  34. Wallace, R. J., N. R. McEwan, F. M. McIntosh, B. Teferedegne, and C. J. Newbold. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 15: 1458-1468.



## The effect of adding different levels of *Ziziphora clinopodioides* to the diet on the *in vitro* digestion and fermentation activity of anaerobic bacteria and fungi in the rumen of fattening Arabi lambs

Morteza Chaji<sup>1\*</sup> and Parvin Alimirzai<sup>2</sup>

Submitted: 10-05-2020

Accepted: 01-03-2021

Chaji, M., and P. Alimirzai. 2022. The effect of adding different levels of *Ziziphora clinopodioides* to the diet on the *in vitro* digestion and fermentation activity of anaerobic bacteria and fungi in the rumen of fattening Arabi lambs. Iranian Journal of Animal Science Research 13(4):513-524.

**Introduction** The ruminants have a stomach with four separate compartments, in the two parts of which, rumen and reticulum, because of the action of their bacteria, protozoa, and other populations such as anaerobic fungi, the energy of plant cell wall are available to the host. The main products of fermentation include volatile fatty acids (VFA) and microbial crude protein, which provide about 80 percent of the energy and 60 to 85 percent of the animal protein requirements, respectively. Therefore, achieving the best efficiency of digestion and microbial fermentation in rumen is very important. On the other hand, the production of methane, carbon dioxide, and ammonia in the rumen causes a loss of energy and protein, an increase in greenhouse gases, and environmental pollution. Therefore, nutritionists, by manipulating ruminal fermentation processes, are looking for ways to reduce energy and protein loss in the form of methane and ammonia and to increase the efficiency of fermentation and synthesis of microbial protein in rumen and increase fiber digestion. For this purpose, several additives such as organic acids, yeasts, enzymes, buffers, and antibiotics have been used. In recent decades, medicinal plants have attracted a lot of attention due to their ability as an alternative to growth stimulants and antibiotics in animal and poultry nutrition. In this regard, the plants of the Lamiaceae (mints) family, which are considered as a medicinal plant with high antimicrobial properties, have been considered. The perennial species of *Ziziphora clinopodioides* belongs to this family, Lamiaceae. The *Ziziphora clinopodioides* is widespread in the north, center, northwest, south, and northeast of Iran. Some of the most important active ingredients in this plant are Pulegone, Piperitenone, Yomogi alcohol), DL-Menthol, Carvacrol, Piperitenone,  $\gamma$ -Terpinene, and Carnoon. Since the activity of rumen anaerobic fungi and bacteria is important in the digestion of feed and considering that there is no information about the effect of adding this plant to the diet on the activity of bacteria and fungi isolated from the rumen, the latency is very limited. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of using *Ziziphora clinopodioides* in the diet of fattening lambs as a supplement, on digestion and fermentation activity of their rumen bacteria and fungi.

**Materials and Methods** Initially, the best amount of *Ziziphora clinopodioides* supplement in the diet was determined by the two-steps digestion method. Therefore, six treatments containing zero (control), 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, and 1% powdered *Ziziphora clinopodioides* plants were added to a standard diet of fattening lambs. Then, based on the results, three treatments containing zero (control), 0.2%, and 0.4% were selected among them to determine the effect of *Ziziphora clinopodioides* supplement on the activity of ruminal anaerobic fungi and bacteria. The rumen fluid required for the two-steps digestion experiment and the specific culture medium of bacteria and fungi were prepared from four male lambs fed a fattening lamb diet with similar ingredients and compositions to the diet of *in vitro* section, through a stomach tube. Then, anaerobic bacteria and fungi were isolated and purified from their ruminal fluid.

**Results and Discussion** Concentration of ammonia nitrogen and pH in the specific culture medium of rumen fungi at the first, third, and sixth days of incubation and the average concentration of the whole period, and also at

1- Professors, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran.

2- M.Sc. Graduated Student of Animal Nutrition, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran.

(\*Corresponding Author Email: : chaji@asnruk.ac.ir)

Doi:10.22067/ijasr.2021.38294.0

24, 48 and 72 hours after initiation of incubation of experimental diets with bacteria, were not affected by experimental treatments. The *in vitro* digestibility of dry matter, neutral detergent fiber (NDF), and acid detergent fiber (ADF) increased significantly ( $P < 0.05$ ), as an influence from the addition of *Ziziphora clinopodioides* supplements to the diet of fattening lambs. The highest and lowest dry matter, NDF, and ADF digestibility was observed in the control diet and diet containing 0.4% *Ziziphora clinopodioides*, respectively; and there was a numerical and non-significant difference between diets containing *Ziziphora clinopodioides*. The digestibility of dry matter and NDF of experimental diets by ruminal anaerobic fungi on the first, third, and sixth days of incubation, and ruminal bacteria at 24, 48 and 72 hours after initiation of incubation, and the average of the whole experimental period increased significantly under the influence of *Ziziphora clinopodioides* supplementation in the diet of fattening lambs. There was no difference between diets containing *Ziziphora clinopodioides* in the activity of anaerobic rumen fungi and bacteria in the digestion of diets. Increasing and improving the digestibility of diet nutrients may be due to changes in the microbial population and improved digestion and fermentation activity of them as a result of secondary compounds of *Ziziphora clinopodioides*. It has been suggested that some secondary metabolites, such as phenolic compounds (also found in *Ziziphora clinopodioides*), selectively inhibit the activity of amylolytic and proteolytic bacteria, without affecting other groups such as cellulolytic bacteria. Therefore, this selective effect leads to the competitive elimination of some species in favor of other species, therefore, the raw materials of the environment are provided for the activity of other species, perhaps this mechanism is a factor in improving digestibility in diets containing *Ziziphora clinopodioides*. consistent with the results of the present experiment, increasing the digestibility and fermentation of sugarcane top or diets have been reported by adding *Ziziphora clinopodioides* to the diet of lambs or thistle (such as *Ziziphora clinopodioides* containing tannins) in the diet of calves. The supplementation of the *Trachyspermum* plant (has thymol and  $\gamma$ -Terpinene similar to *Ziziphora clinopodioides*) to diet also was increased the digestion and fermentation, which is consistent with the present experiment.

**Conclusion** Overall, the use of *Ziziphora clinopodioides* supplement in the diet of fattening lambs improved the digestive activity of anaerobic fungi and bacteria isolated from their rumen.

**Keywords:** Isolated bacteria, Isolated fungi, Specific culture medium, Two-steps digestion